



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

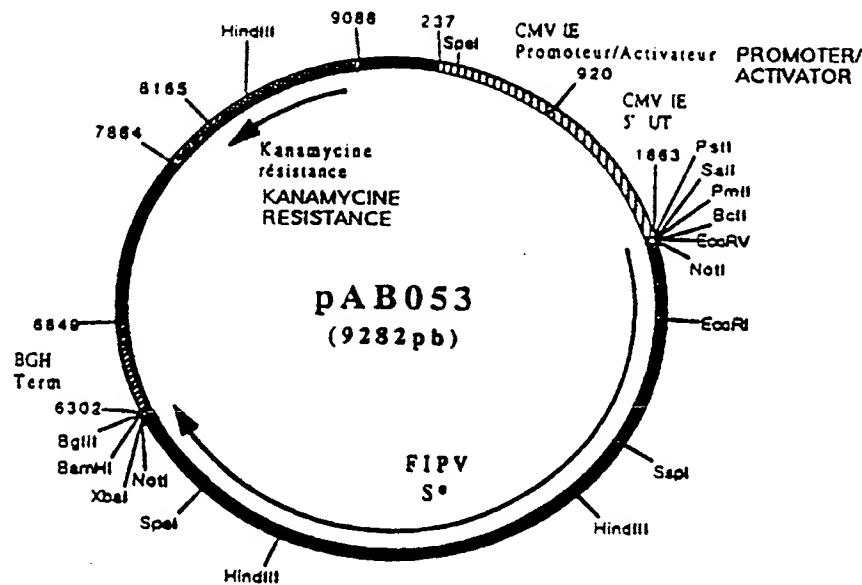
(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 15/48, 15/35, 15/50, 15/38, 15/40, 15/49, 15/47, A61K 39/295		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/03661 (43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01315		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)		Publiée	
(30) Données relatives à la priorité: 96/09337 19 juillet 1996 (19.07.96) FR		Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). BAUDU, Philippe [FR/FR]; 58, avenue Edouard Simon, F-69290 Craponne (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR]; 11, Chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR).			
(74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).			

(54) Title: FELINE POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA

(54) Titre: FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE FELIN

(57) Abstract

A cat vaccine formula including at least three polynucleotide vaccine valencies that each include a plasmid containing a cat pathogen valency gene capable of being expressed *in vivo* in host cells. Said valencies are selected from the group which consists of feline leukaemia virus, panleukopenia virus, infectious peritonitis virus, coryza virus, calicivirus disease virus, feline immunodeficiency virus and optionally rabies virus. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of env and gag for feline leukaemia, VP2 for panleukopenia, modified S, M and N for infectious peritonitis, gB and gD for coryza, capsid for calicivirus disease, env and gag/pro for feline immunodeficiency and G for rabies.



FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE FELIN

La présente invention a trait à une formule de vaccin permettant la vaccination des chats contre un certain nombre de pathologies. Elle a également trait à une méthode de vaccination correspondante.

On a déjà proposé par le passé des associations de vaccins contre certains virus canins.

Les associations développées jusqu'à présent étaient réalisées à partir de vaccins inactivés ou de vaccins vivants et éventuellement de mélanges de tels vaccins. Leur mise en oeuvre pose des problèmes de compatibilité entre valences et de stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences de vaccin, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés ou au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose également le problème de la conservation de tels vaccins combinés et de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

Les demandes de brevet WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660 ont fait usage de la technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide apte à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré dans le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées (intraperitoneale, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique, mucosale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant de transfecter à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés par exemple au sein de liposomes ou de lipides cationiques.

L'invention se propose donc de fournir une formule de

differentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différences mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression *in vivo* par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

De préférence, la formule de vaccin selon l'invention comprend les valences panleucopénie, coryza et calicivirose.

On pourra ajouter les valences leucémie féline, 15 immunodéficience féline et/ou périctonite infectieuse.

En ce qui concerne la valence coryza, on préfère mettre en œuvre les deux gènes codant pour gB et gD, dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou utiliser l'un ou l'autre de ces gènes.

20 Pour la valence leucémie féline, on utilise de préférence les deux gènes env et gag/pol intégrés dans deux plasmides différents ou dans un seul et même plasmide où le gène env seul.

Pour la valence immunodéficience féline, on préférera utiliser les deux gènes env et gag/pro dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou un seul de ces gènes. De préférence encore, on utilise le gène env de FeLV-A ou les gènes env de FeLV-A et FeLV-B.

30 Pour la valence périctonite infectieuse, on préfère utiliser l'ensemble des deux gènes M et S modifié dans deux plasmides différents ou dans un seul et même plasmide, ou l'un ou l'autre de ces gènes. S sera modifié pour rendre inactifs les épitopes facilitants majeurs, de préférence selon l'enseignement de la demande PCT/FR95/01128.

35 La formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter sous un volume de dose compris entre 0,1 et 3 ml et en particulier entre 0,5 et 1 ml.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg et plus préférentiellement

combinaisons, la composition des plasmides, les volumes de dose, les doses, etc.

Les formules de vaccin monovalent peuvent aussi être utilisées (i) pour la préparation d'une formule de vaccin polyvalent tel que décrit plus haut, (ii) à titre individuel contre la pathologie propre, (iii) associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie ou (iv) comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les chats primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique (monovalent ou multi-valent) du type de ceux de l'art antérieur, choisi notamment dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmides ou antigène(s) assurant une protection croisée.

De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'instauration d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus et une formule de vaccin selon l'invention pour le rappel. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des chats, comprenant l'administration d'une formule de vaccin efficace telle que décrit plus haut. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de formule de vaccin, ces doses pouvant être

Liste des figures

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
Figure N° 2 : Plasmide pPB179
Figure N° 3 : Séquence du gène env FeLV-B
5 Figure N° 4 : Plasmide pPB180
Figure N° 5 : Séquence gag/pol du virus FeLV-A souche Glasgow-1
Figure N° 6 : Plasmide pAB009
Figure N° 7 : Plasmide pAB053
Figure N° 8 : Plasmide pAB052
10 Figure N° 9 : Plasmide pAB056
Figure N° 10 : Plasmide pAB028
Figure N° 11 : Plasmide pAB029
Figure N° 12 : Plasmide pAB010
Figure N° 13 : Plasmide pAB030
15 Figure N° 14 : Plasmide pAB083
Figure N° 15 : Plasmide pAB041

Liste des séquences SEQ ID N°

- 20 SEQ ID N° 1 : Oligonucléotide PB247
SEQ ID N° 2 : Oligonucléotide PB249
SEQ ID N° 3 : Oligonucléotide PB281
SEQ ID N° 4 : Oligonucléotide PB282
SEQ ID N° 5 : Séquence du gène env du virus FeLV-B
25 SEQ ID N° 6 : Oligonucléotide PB283
SEQ ID N° 7 : Oligonucléotide PB284
SEQ ID N° 8 : Séquence du gène gag/pol du virus FeLV-A (Glasgow-1)
SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide AB021
SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide AB024
30 SEQ ID N° 11 : Oligonucléotide AB103
SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide AB112
SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide AB113

EXEMPLES**Exemple 1 : Culture des virus**

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont bien connus de l'homme du métier. brièvement, des cellules sensibles au virus utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) ou un autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à 37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique complet (en moyenne 36 heures).

Exemple 2 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

Exemple 3 : Isolement des ARNs génomiques viraux

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987. 162. 156-159).

11

PB249 (28 mer) (SEQ ID N° 2)

5' TTTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCG 3'

pour amplifier un fragment de 1947 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine Env du virus FeLV-A (souche Glasgow-1) sous la forme d'un
5 fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour donner un fragment Sall-BamHI de 1935 pb.
Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB179 (6804 pb) (Figure N° 2).

10

Exemple 8 : Construction du plasmide pPB180 (gène env virus FeLV-B)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la leucémie féline (sous-type FeLV-B), préparé. selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

15 PB281 (29 mer) (SEQ ID N° 3)

5' TTTGTCGACATGGAAGGTCCAACGCACCC 3'

PB282 (32 mer) (SEQ ID N° 4)

5' TTGGATCCTCATGGTCGGTCCGGATCATATTG 3'

pour amplifier un fragment de 2005 pb contenant le gène codant pour la
20 glycoprotéine Env du virus FeLV-B (Figure N° 3 et SEQ ID N° 5) sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour donner un fragment Sall-BamHI de 1995 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pPB180 (6863 pb) (Figure

25 N° 4).

Exemple 9 : Construction du plasmide pPB181 (gène FeLV gag/pol)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la leucémie féline (sous-type FeLV-A) (Souche
30 Glasgow-1), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB283 (33 mer) (SEQ ID N° 6)

la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB103 (38 mer) (SEQ ID N° 11)

5'ATAAGAACATGCGGCCGCATGATTGTGCTCGTAACTTGCC 3'

AB112 (25 mer) (SEQ ID N° 12)

5 5'CGTACATGTGGAATTCCACTGGTTG 3'

pour amplifier la séquence de la partie 5' du gène codant pour la glycoprotéine S du virus sous la forme d'un fragment *NotI-EcoRI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 492 pb a été digéré par *NotI* et *EcoRI* pour libérer un fragment *NotI-EcoRI* de 467 pb (fragment A).

10 Le plasmide pJCA089 (Demande de brevet PCT/FR95/01128) a été digéré par *EcoRI* et *Spel* pour libérer un fragment de 3378 pb contenant la partie centrale du gène codant pour la glycoprotéine S modifiée du virus de la PIF (fragment B).

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec

15 l'ARN génomique du virus de la PIF (Souche 79-1146), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB113 (25 mer) (SEQ ID N° 13)

5'AGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTG 3'

AB104 (37 mer) (SEQ ID N° 14)

20 5'ATAAGAACATGCGGCCGCTTAGTGGACATGCACCTTTTC 3'

pour amplifier la séquence de la partie 3' du gène codant pour la glycoprotéine S du virus de la PIF sous la forme d'un fragment *Spel-NotI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 543 pb a été digéré par *Spel* et *NotI* pour libérer un fragment *Spel-NotI* de 519 pb (fragment C).

25 Les fragments A, B et C ont ensuite été ligaturés ensemble dans le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré par *NotI*, pour donner le plasmide pAB053 (9282 pb), qui contient le gène S modifié dans la bonne orientation par rapport au promoteur (Figure N° 8).

30 Exemple 12 : Construction du plasmide pAB052 (gène FIPV M)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la péritonite infectieuse féline (PIF) (Souche 79-

15

- selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:
- AB061 (36 mer) (SEQ ID N° 19)
5'AAAAGTGCAGAACATGTCCACTCGTGGCGATCTTG 3'
- AB064 (40 mer) (SEQ ID N° 20)
- 5 5'ATAAGAATGCGGCCGCTTAGACAAGATTGTTCACTAC 3'
pour amplifier un fragment de 2856 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du virus FHV-1 sous la forme d'un fragment PstI-NotI. Après purification, le produit de PCR a été digéré par *PstI* et *NotI* pour donner un fragment *PstI-NotI* de 2823 pb.
- 10 Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *PstI* et *NotI*, pour donner le plasmide pAB028 (7720 pb) (Figure N° 11).
- Exemple 15 : Construction du plasmide pAB029 (gène FHV gD)**
- 15 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus félin (FHV-1) (Souche C-27) (S. Spatz *et al.* J. Gen. Virol. 1994. 75. 1235-1244), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:
- AB065 (36 mer) (SEQ ID N° 21)
5'AAAAGTGCAGCCAATGATGACACGTCTACATTTTG 3'
- 20 AB066 (33 mer) (SEQ ID N° 22)
5'GGAAGATCTTAAGGATGGTGAGTTGTATGTAT 3'
pour amplifier le gène codant pour la glycoprotéine gD du virus FHV-1 sous la forme d'un fragment *PstI-BgIII*. Après purification, le produit PCR de 1147 pb a été digéré par *PstI* et *BgIII* pour isoler un fragment *PstI-BgIII* de 1129 pb. Ce
- 25 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec *PstI* et *BgIII*, pour donner le plasmide pAB029 (5982 pb) (Figure N° 12).

- Exemple 16 : Construction du plasmide pAB010 (gène FCV C)**
- 30 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du calicivirus félin (FCV) (Souche F9) (M. Carter *et al.* Virology. 1992. 190. 443-448), préparé selon la technique de l'exemple 3, et

(R. Olmsted et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. 8088-8096.), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

AB154 (32 mer) (SEQ ID N° 27)

5'ACGCGTCGACATGGGAAATGGACAGGGCGAG 3'

5 AB155 (33 mer) (SEQ ID N° 28)

5'TGAAGATCTTCACTCATCCCCCTCAGGAAGAGC 3'

pour amplifier un fragment de 4635 pb contenant le gène codant pour les protéines Gag et Pro du virus FIV (souche Petaluma) sous la forme d'un fragment SalI-BglII. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par SalI

10 et BglII pour donner un fragment SalI-BglII de 4622 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec SalI et BglII, pour donner le plasmide pAB083 (7436 pb) (Figure N° 15).

15 Exemple 19 : Construction du plasmide pAB041 (gène G du virus de la rage)
Une réaction RT-PCR selon la technique de l'exemple 5 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la rage (Souche ERA) (A. Anilionis et al. Nature. 1981. 294. 275-278), préparé selon la technique de l'exemple 3, et avec les oligonucléotides suivants:

20 AB011 (33 mer) (SEQ ID N° 29)

5'AAAAACTGCAGAGATGGTCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'

pour amplifier un fragment de 1589 pb contenant le gène codant pour la 25 glycoprotéine G du virus de la rage. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par PstI et BamHI pour donner un fragment PstI-BamHI de 1578 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 6), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide pAB041 (6437 pb) (Figure N° 16).

30

Exemple 20 : Production et purification des plasmides

Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on

1 ml administré en 10 points de 0,1 ml ou en 20 points de 0,05 ml. Les administrations intradermiques sont réalisées après avoir rasé la peau (flanc thoracique en général) ou bien au niveau d'une région anatomique relativement glabre, par exemple la face interne de la cuisse.

- 5 On peut aussi utiliser un appareil d'injection à jet liquide (sans aiguille) pour les injections intradermiques.

ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg, plus préférentiellement encore de 1 µg à 250 µg de chaque plasmide.

5 8. Utilisation d'un ou de plusieurs plasmides tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les chats primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant le ou les antigènes codés par le ou les plasmides ou 10 antigènes assurant une protection croisée.

15 9. Kit de vaccination pour chat regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et un vaccin pour chat choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée, pour une administration de ce dernier en primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de 20 vaccin.

25 10. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, accompagnée d'une notice indiquant que cette formule est utilisable en rappel d'un premier vaccin pour chat choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une 30 protection croisée.

1/19

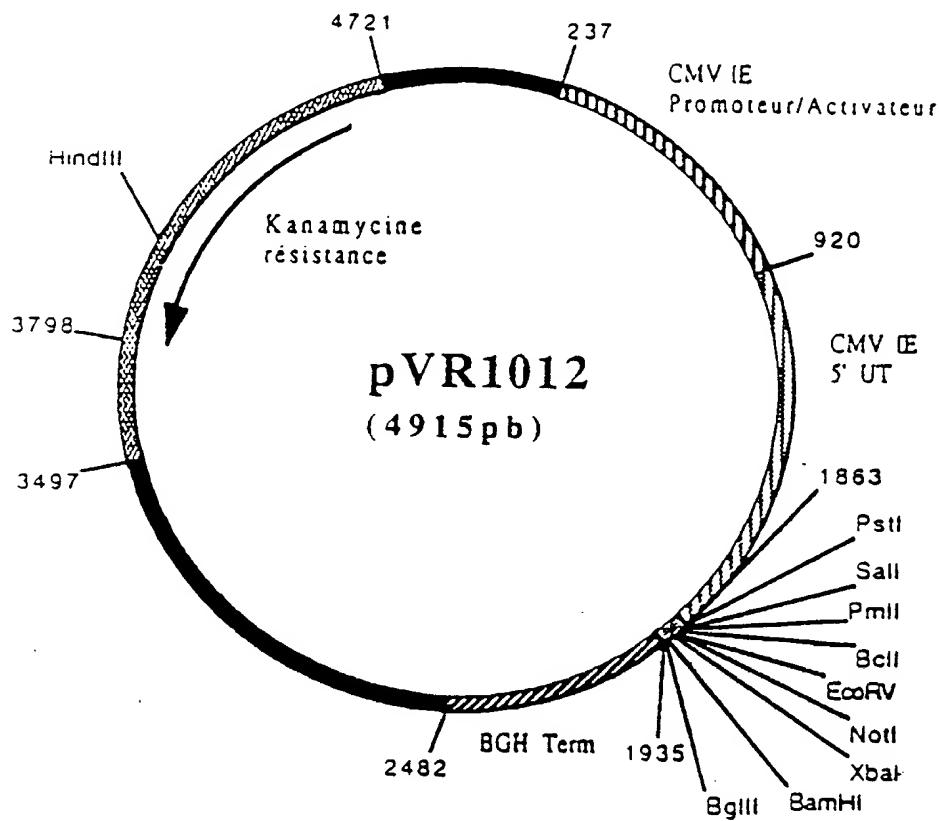


Figure N° 1

2/19

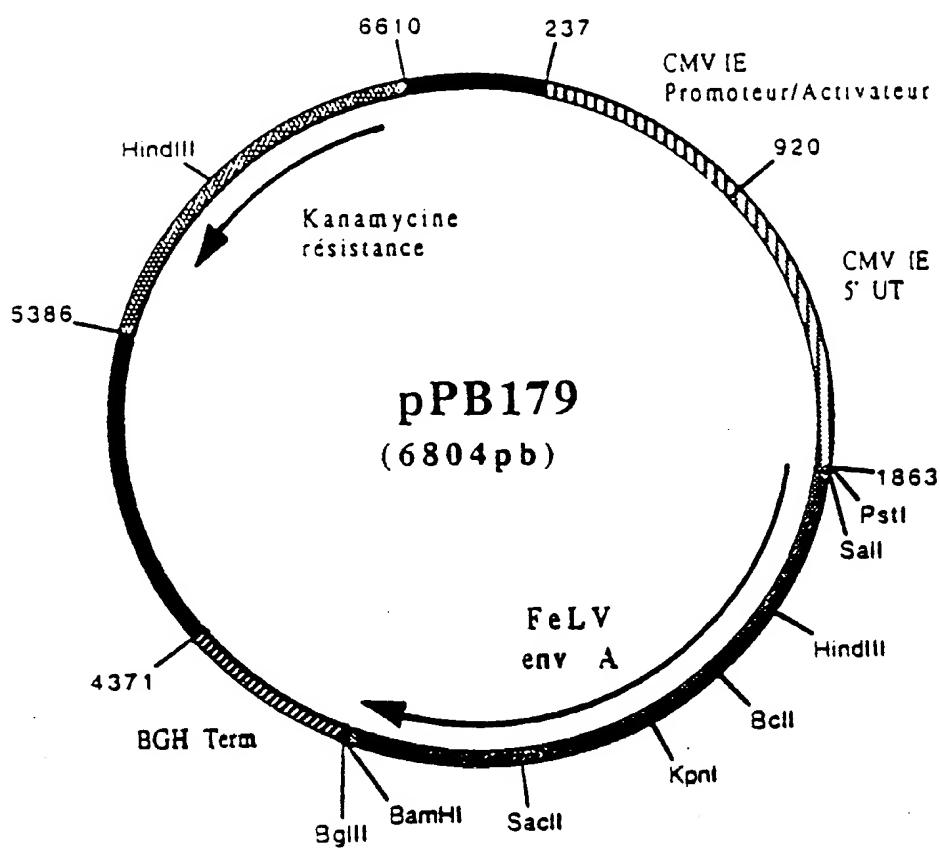


Figure N° 2

3/19

1 ATGCAAGGTCAAACGCACCCAAAACCCTCTAAAGATAAGACTTTCTCGTGGGACCTAATCATT
 1> MetGluGlyProThrHisProLysProSerLysAspLysThrPheSerTrpAspLeuMetIle
 64 CTGCTGGCGCTTACTAAAGACTGGACGTGGGAATGCCAATCCTAGTCGGCACCAAATATAT
 22> LeuValGlyValLeuLeuArgLeuAspValGlyMetAlaAsnProSerProHisGlnIleTyr
 127 AATGTAACCTGGACAATAACCAACCTTGTAACTGGAACAAAGGCTAACGCCACCTCCATGTTG
 43> AsnValThrTrpThrIleThrAsnLeuValThrGlyThrLysAlaAsnAlaThrSerMetLeu
 190 GGAACCCCTGACAGACGCTTCCCTACCATGTATTTGACTTATGTGATATAATAGGAAATACA
 64> GlyThrLeuThrAspAlaPheProThrMetTyrPheAspLeuCysAspIleIleGlyAsnThr
 253 TGGAAACCCCTTCAGATCAAGAACCATCCCAGGGTATGGATGTGATCAGCTATGAGGGAGGTGG
 65> TyrAsnProSerAspCinGluProPheProGlyTyrGlyCysAspGlnProMetArgArgTrp
 316 CGACAGAGAAACACACCCCTTTATGTCCTGCCAGGACATGCCAACCGGAACCAATGTGGGGGG
 106> ArgGlnArgAsnThrProPheTyrValCysProGlyHisAlaAsnArgLysGlnCysGlyGly
 379 CCACAGGATGGTTCTCGCCTGTATGGGGTTGCAGGACACCACGGGAAACCTATTGGAGACCC
 127> ProGlnAspGlyPheCysAlaValTrpGlyCysGluThrThrGlyGluThrTyrTrpArgPro
 442 ACCTCCTCATGGGACTACATCACAGTAAAAAAAGGGGTTACTCAGGGAAATATATCAATGTAGT
 148> ThrSerSerTrpAspTyrIleThrValLysGlyValThrGlyIleTyrGlnCysSer
 505 GGAGGTGGTTGGTGTGGGCCCTGTTACGATAAGCTGTTCACTCCTCGACAAACGGGAGCTAGT
 169> GlyGlyGlyTrpCysGlyProCysTyrAspLysAlaValHisSerSerThrGlyAlaSer
 568 GAAGGGGGCCGGTCAACCCCTGATCTTGCATTTACCAAAAGGGAGACAAACATCTGG
 190> GluGlyGlyArgCysAsnProLeuIleLeuGlnPheThrGlnLysGlyArgGlnThrSerTrp
 631 GATGGACCTAAAGTCATGGGGCTACGACTATACCGTTCAAGGATATGACCTATAGCCCTGTT
 211> AspGlyProLysSerTrpGlyLeuArgLeuTyrArgSerGlyTyrAspProIleAlaLeuPhe
 694 TCGGTATCCCGCAAGTAATGACCATTACGCCGCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTG
 232> SerValSerArgGlnValMetThrIleThrProProGlnAlaMetGlyProAsnLeuValLeu
 757 CCTGATAAAAACCCCACCCAGGCAATCTCAAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCAATTCC
 253> ProAspGlnLysProProSerArgGlnSerGlnIleGluSerArgValThrProHisHisSer
 820 CAAGGCAACGGAGGCACCCAGGTGTAACCTTGTAAATGCCCTCATTGCCCTCTACGTACC
 274> GlnGlyAsnGlyGlyThrProGlyValThrLeuValAsnAlaSerIleAlaProLeuArgThr
 883 CCTGTCACCCCCGCAAGTCCAAACGTATAGGGACCGGAAATAGGTTAATAAATTAGTC
 295> ProValThrProAlaSerProLysArgIleGlyThrGlyAsnArgLeuIleAsnLeuValGln
 946 GGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCAAACAAACTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTG
 316> GlyThrTyrLeuAlaLeuAsnAlaThrAspProAsnLysThrLysAspCysTrpLeuCysLeu
 1009 GTTTCTCGACCACCTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACACAGCAACCAAAAC
 337> ValSerArgProProTyrTyrGluGlyIleAlaIleLeuGlyAsnTyrSerAsnGlnThrAsn
 1072 CCCTCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGAAACATAAGCTAACTATATCTGAGGTGTCAGGGCAA
 358> ProSerProSerCysLeuSerThrProGlnHisLysLeuThrIleSerGluValSerGlyGln
 1135 GGAATGTGCATAGGGACTGTTCTAACGACCCACCAGGCTTGTGCAATAAGACACAAACAGGAA
 379> GlyLeuCysIleGlyThrValProLysThrHisGlnAlaLeuCysAsnLysThrGlnGly
 1198 CATAACAGGGGCTCACTATCTAGCCGCCCAATGGCACCTATTGGCCCTGTAACACTGGACTC
 400> HisThrGlyAlaHistyrlLeuAlaAlaProAsnGlyThrTyrTrpAlaCysAsnThrGlyLeu

Figure N° 3

4/19

1261 ACCCATGCATTCCATGGCAGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTGTGTCTTAATCGAATT
 421 ▶ Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys Val Leu Ile Glu Leu
 1324 TGGCCCAGAGTGACCTACCACATCAACCGAATACATTACACACATTGACAAAGCTGTCAGG
 442 ▶ Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr Ile Tyr Thr His Phe Asp Lys Ala Val Arg
 1387 TTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACCGTTGCCCTATAATGGGAGGACTCACTGTAGGGGGC
 463 ▶ Phe Arg Arg Glu Pro Ile Ser Leu Thr Val Ala Leu Ile Met Gly Gly Leu Thr Val Gly Gly
 1450 ATAGCCGGGGGTGGAACAGGGACTAAAGCCCTCTGAAACAGCCCAGTTCACACAACTA
 484 ▶ Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Glu Thr Ala Gln Phe Arg Gln Leu
 1513 CAAATGGCTATGCACCGAGACATCCAGGCCCTAGAAAGAGTCATTAGTGCCTTAGAAAAATCC
 505 ▶ Gln Met Ala Met His Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Ser Ile Ser Ala Leu Glu Lys Ser
 1576 CTGACCTCCCTCTCCGAGGTAGTCTTACAAAATAGACGGGCTAGATATTCTGTTCTTACAA
 526 ▶ Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln
 1639 AAGGGAGGGCTCTGTGCCGCCTAAAGGAAGAATGCTGCTCTATGCAGATCACACCGGACTC
 547 ▶ Lys Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu
 1702 GTCAGAGACAATATGGCTAAATTAAAGAGAAAGACTGAAACAGCGACAACAACACTGTTGACTCC
 568 ▶ Val Arg Asp Asn Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys Gln Arg Gln Gln Leu Phe Asp Ser
 1765 CAACAGGGATGGTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCCCCCTGGTTACAACCTAATTCTCC
 589 ▶ Gln Asn Gly Trp Phe Glu Gly Trp Phe Asn Lys Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Ser
 1828 ATTATAGGCCCTTACTAATCCTACTCCTAATTCTCCTTCCGGCCCAGCATCCTTAACCGA
 610 ▶ Ile Ile Gly Pro Leu Ile Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg
 1891 TTAGTGCAATTCTGAAAAGACAGAAATATCTGTGGTACAAGCCTTAATTAAACCAACAGTAC
 631 ▶ Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Ile Leu Thr Gln Gln Tyr
 1954 CAACAGATAACAGCAATATGATCCGGACCGACCAGATGA
 652 ▶ Gln Gln Ile Gln Gln Tyr Asp Phe Asp Arg Phe ...

Figure N° 3 (suite et fin)

5/19

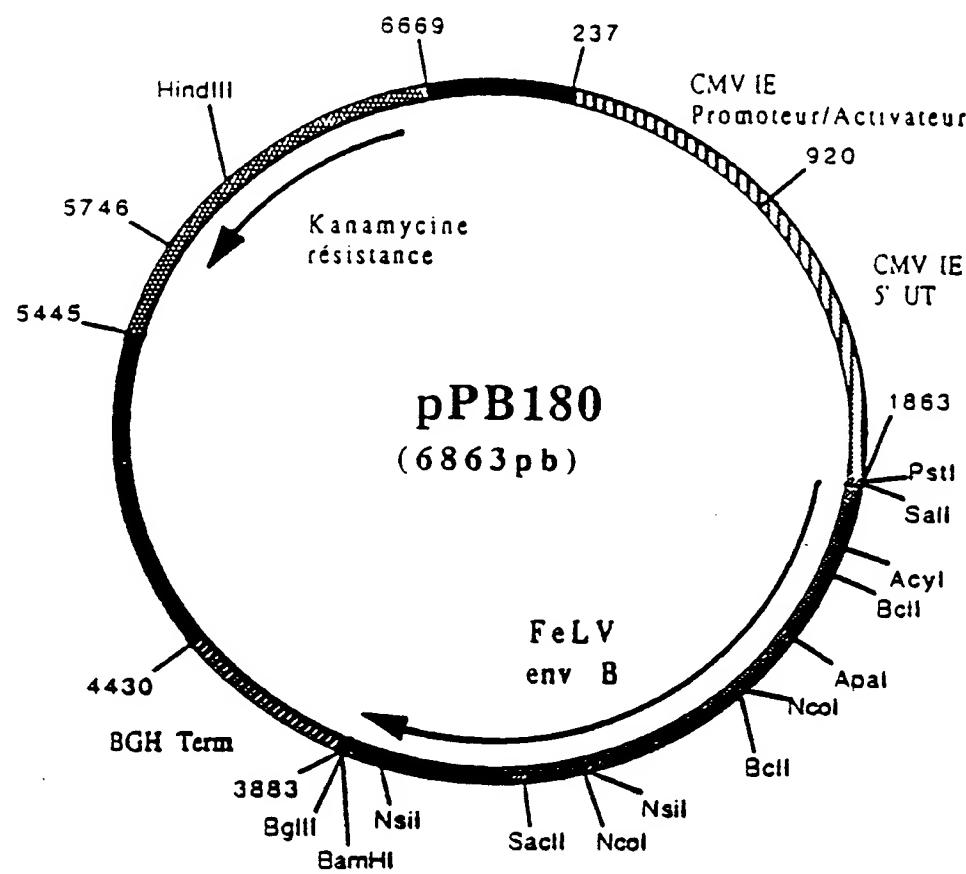


Figure N° 4

6/19

Figure N° 5

7/19

1195 CCTGCAAGACGCCCACTAATTGGCACAGGTAAACCAGGTTTACAAGGGAAAGAGGAAACG
 400 ▶ AlaAlaArgArgProThrAsnLeuAlaGlnValLysGlnValValGlnGlyLysGluGluThr

 1261 CCAGCAGCATTAGAAAGATTAAAAGAGGCTTATAGAACATGTACACTCCCTATGACCTGAG
 421 ▶ ProAlaAlaPheLeuGluArgLeuLysGluAlaTyrArgMetTyrThrProTyrAspProGlu

 1324 GACCCAGGGCAAGCGGCTAGTGTATCCTATCCTTATATACCAGTCTAGCCCAGATAAAGA
 442 ▶ AspProGlyGlnAlaAlaSerValIleLeuSerPheIleTyrGlnSerSerProAspIleArg

 1387 AATAAGTTACAAGGCTAGAAGGCCTACAAGGGTTACCCCTATCTGATCTGCTAAAAGAGGCA
 463 ▶ AsnLysLeuGlnArgLeuGluGlyLeuGlnGlyPheThrLeuSerAspLeuLeuLysGluAla

 1450 GAAAAGATATAACAACAAAAGGGAGACCCAGAGGAAAGGAAAGAAAGATTATGGCAGCGACAG
 484 ▶ GluLysIleTyrAsnLysArgGluThrProGluGluArgGluArgLeuTrpGlnArgGln

 1513 GAAGAAAGAGATAAAAAGGCCACAAGGAGATGACTAAAGTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAG
 505 ▶ GluGluArgAspLysLysArgHisLysGluMetThrLysValLeuAlaThrValValAlaGln

 1576 AATAGAGATAAGGATAGAGAAAGAAAGTAAACTGGGGATCAAAGGAAATACCTCTGGGAAA
 526 ▶ AsnArgAspLysAspArgGluSerLysLeuGlyAspGlnArgLysIleProLeuGlyLys

 1639 GACCACTGTGCCCTATTGCAAGGAAAAGGGCATTGGGTCGCGATTGCCCAAACGACCCAGG
 547 ▶ AspGlnCysAlaTyrCysLysGluLysGlyHisTrpValArgAspCysProLysArgProArg

 1702 AAGAAACCCGCCAActCCACTCTCCTCAACTTAGGAGATTAGGAGAGTCAGGGCCAGGACCC
 568 ▶ LysLysProAlaAsnSerThrLeuLeuAsnLeuGlyAsp...
 1 ▶ GluIleArgArgValArgAlaArgThrPr

 1765 CCCCCCTGAGCCCAGGATAACCTAAAAATAGGGGGCAACCGGTGACTTTCTGGTGGAC
 10 ▶ oProProGluProArgIleThrLeuLysIleGlyGlyGlnProValThrPheLeuValAspTh

 1828 GGGAGCCCAGCACTCAGTACTGACTCGACCAGATGGACCTCTCAGTGACCGCACAGCCCTGGT
 31 ▶ rGlyAlaGlnHisSerValLeuThrArgProAspGlyProLeuSerAspArgThrAlaLeuVa

 1891 GCAAGGAGCCACGGGAAGCAAAAActACCGGTGGACCACCGACAGGAGGGTACAACGGCAAC
 52 ▶ 1GlnGlyAlaThrGlySerLysAsnTyrArgTrpThrAspArgArgValGlnLeuAlaTh

 1954 CGGTAAGGTGACTCATTCTTTTATATGTACCTGAATGTCCCTACCGTTATTAGGGAGAGA
 73 ▶ rGlyLysValThrHisSerPheLeuTyrValProGluCysProTyrProLeuLeuGlyArgAs

 2017 CCTATTAACTAACTTAAGGCCAAATCCATTACCGGAGAAGGGGCTAATGTTGGGCC
 94 ▶ pLeuLeuThrLysLeuLysAlaGlnIleHisPheThrGlyGluGlyAlaAsnValValGlyPr

 2080 CAGGGGTTTACCCCTACAAGTCCTACTTACAATTAGAAGAGGAGTATCGGCTATTTGAGCC
 115 ▶ oArgGlyLeuProLeuGlnValLeuThrLeuGlnLeuGluGluGluTyrArgLeuPheGluPr

 2143 AGAAAGTACACAAAACAGGAGATGGCACACTGGCTAAAAACTTCCCCAGGCGTGGCAGA
 136 ▶ oGluSerThrGlnLysGlnGluMetAspThrTrpLeuLysAsnPheProGlnAlaTrpAlaG

Figure N° 5 (suite)

8/19

2206 AACACCGAGGTATGGGAATGGCTCATTGTCAAGCCCCCTTCTCATTCAACTTAAGGCTACTGC
 157>uThrGlyGlyMetGlyMetAlaHisCysGlnAlaProValLeuIleGlnLeuLysAlaThrAla
 2269 CACTCCAATCTCCATCCGACAGTATCCTATGCCCATGAAGCGTACCAGGGATTAAAGCCTCA
 178>aThrProIleSerIleArgGlnTyrProMetProHisGluAlaTyrGlnGlyIleLysProHi
 2332 TATAAGAAGAACATGCTAGATCAAGGCATCCTCAAGCCCTGCCAGTCCCCATGGAATACACCCT
 199>sIleArgArgMetLeuAspGlnGlyIleLeuLysProCysGlnSerProTrpAsnThrProLe
 2395 ATTACCTGTTAAGAACGCCAGGGACCGAGGATTACAGACCAGTCAGGACTTAAGAGAAAGTAAA
 220>uLeuProValLysLysProGlyThrGluAspTyrArgProValGlnAspLeuArgGluValAs
 2458 CAAAAGAGTAGAACAGACATCCATCCTACTGTGCCAAATCCATATAACCTCCTTAGCACCCCTCCC
 241>nLysArgValGluAspIleHisProThrValProAsnProTyrAsnLeuLeuSerThrLeuP
 2521 GCCGTCTCACCCCTGGTACACTGTCCTAGATTAAAGGACGCTTTCTGCCTGCGACTACA
 262>oProSerHisProTrpTyrThrValLeuAspLeuLysAspAlaPhePheCysLeuArgLeuHi
 2584 CTCTGAGAGTCAGTTACTTTGCATTGAATGGAGAGATCCAGAAATAGGACTGTCAGGGCA
 283>sserGluSerGlnLeuLeuPheAlaPheGluTrpArgAspProGluIleGlyLeuSerGlyG1
 2647 ACTAACCTGGACACGCCCTCCTCAGGGTTCAAGAATAGCCCCACCCATTGATGAGGCCCT
 304>nLeuThrTrpThrArgLeuProGlnGlyPheLysAsnSerProThrLeuPheAspGluAlaLe
 2710 GCACTCAGACCTGGCCGATTCAGGGTAAGGTACCCGGCTCTAGCCTCCTACAATATGTAGA
 325>uHisSerAspLeuAlaAspPheArgValArgTyrProAlaLeuValLeuGlnTyrValAs
 2773 TGACCTCTTGCTGGCTGGCAACCAGGACTGAATGCCCTGGAAGGGACTAAGGCACTCCTGA
 346>pAspLeuLeuAlaAlaAlaAlaThrArgThrGluCysLeuGluGlyThrLysAlaLeuLeuG1
 2836 GACTTGGCAATAAGGGTACCGAGCCTCTGGAAAGGAGGCCAAATTGCTGCAAGAAGT
 367>uThrLeuGlyAsnLysGlyTyrArgAlaSerGlyLysLysAlaGlnIleCysLeuGlnGluVa
 2899 CACATACCTGGGTACTCTTAAAAGATGCCAAAGGTGGCTTACCAAAGCTCGAAAGAAC
 388>1ThrTyrLeuGlyTyrSerLeuLysAspGlyGlnArgTrpLeuThrLysAlaArgLysGluAl
 2962 CATCCTATCCATCCCTGTGCCAAAAACCCACGACAAGTGAGAGAGTTCTTGGAACTGCAG
 409>aIleLeuSerIleProValProLysAsnProArgGlnValArgGluPheLeuGlyThrAla

Figure N° 5 (suite et fin)

9/19

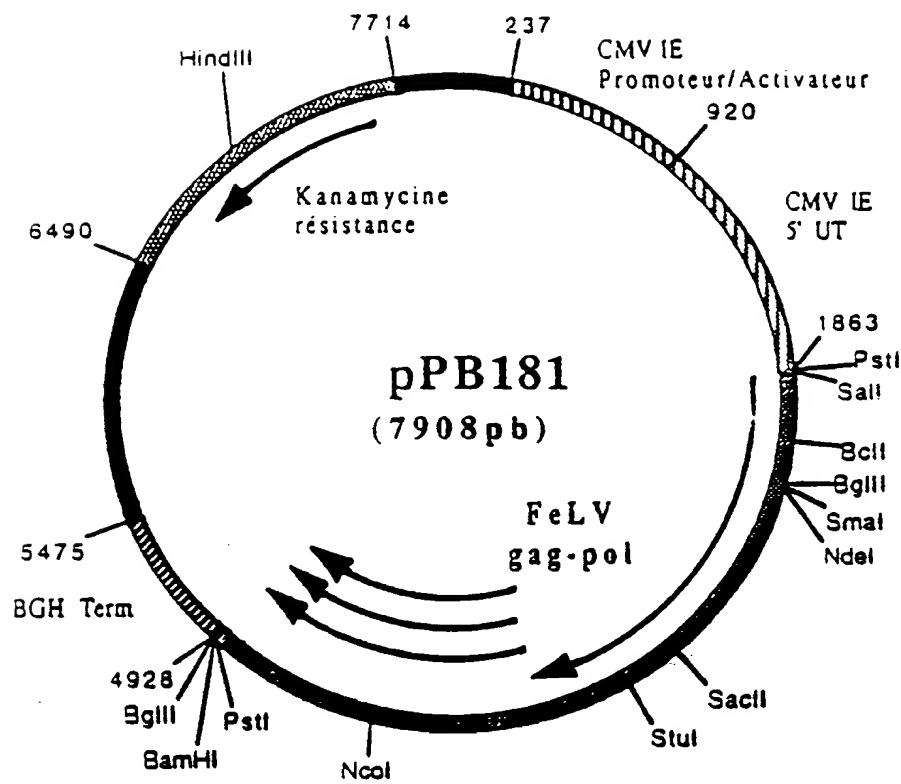


Figure N° 6

10/19

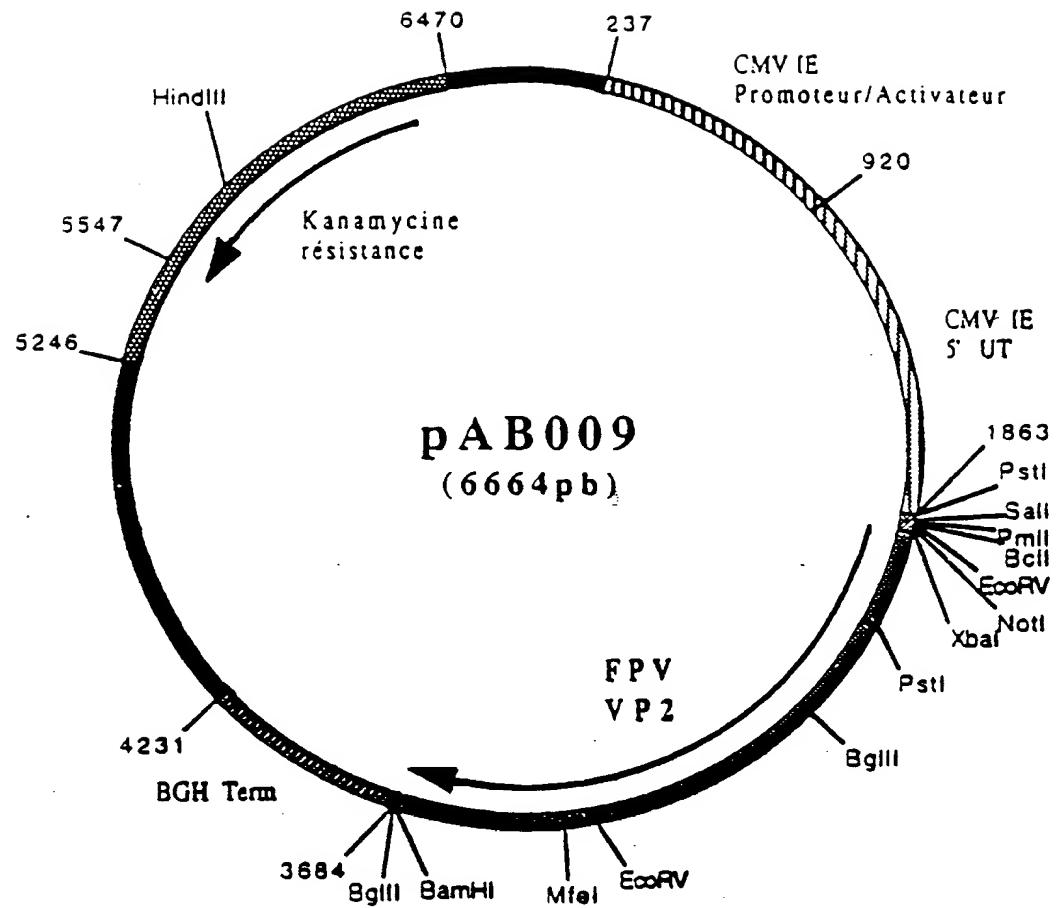


Figure N° 7

11/19

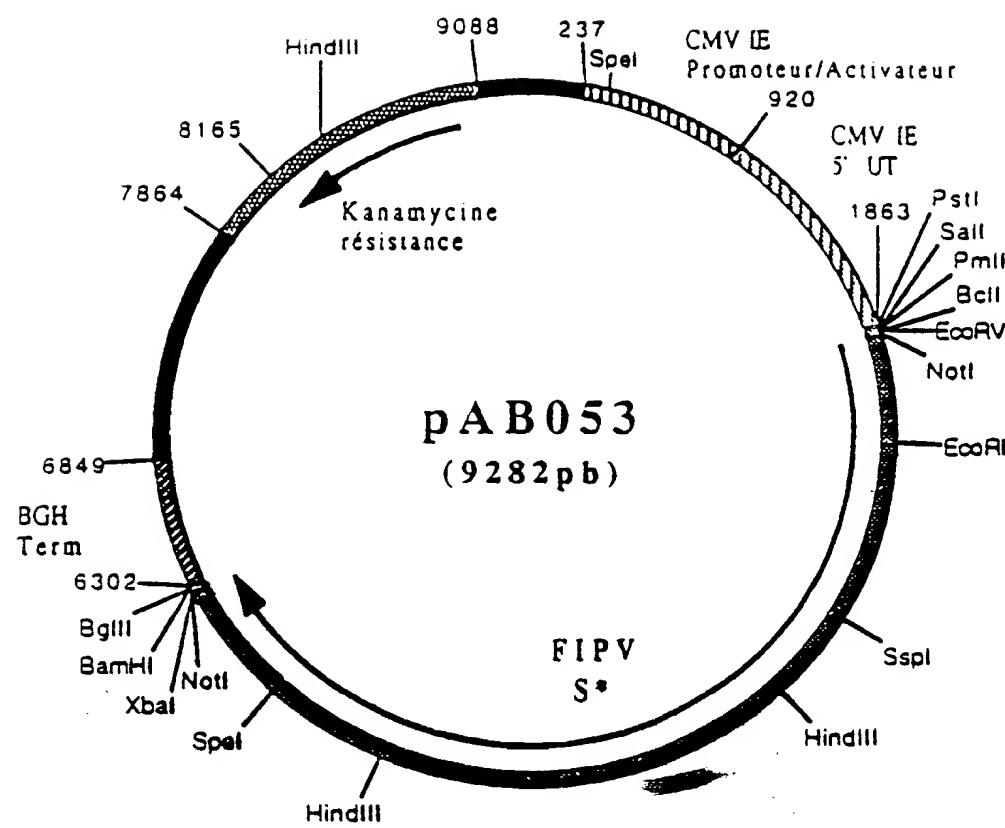


Figure N° 8

12/19

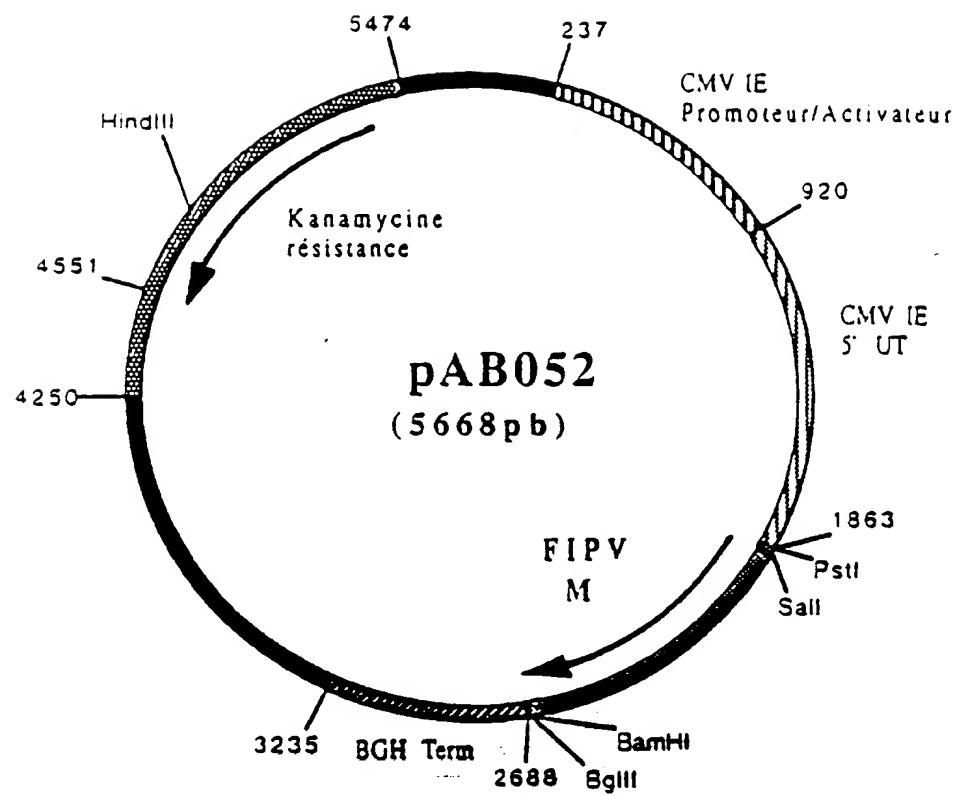


Figure N° 9

13/19

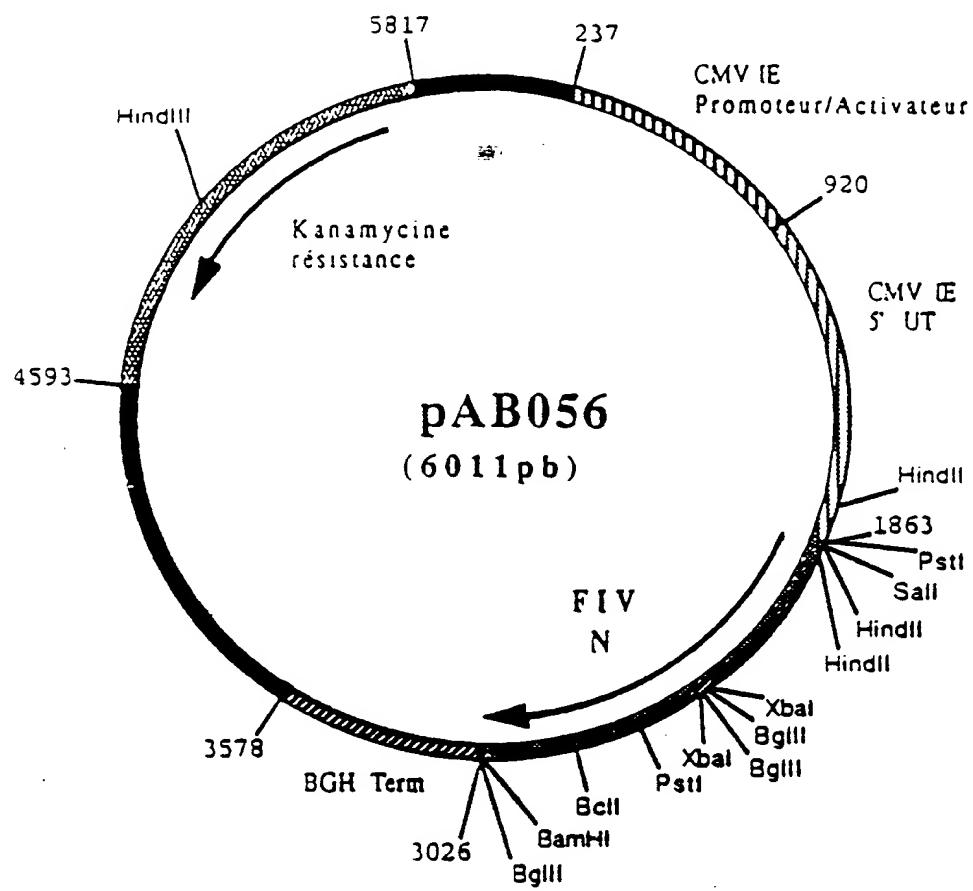


Figure N° 10

14/19

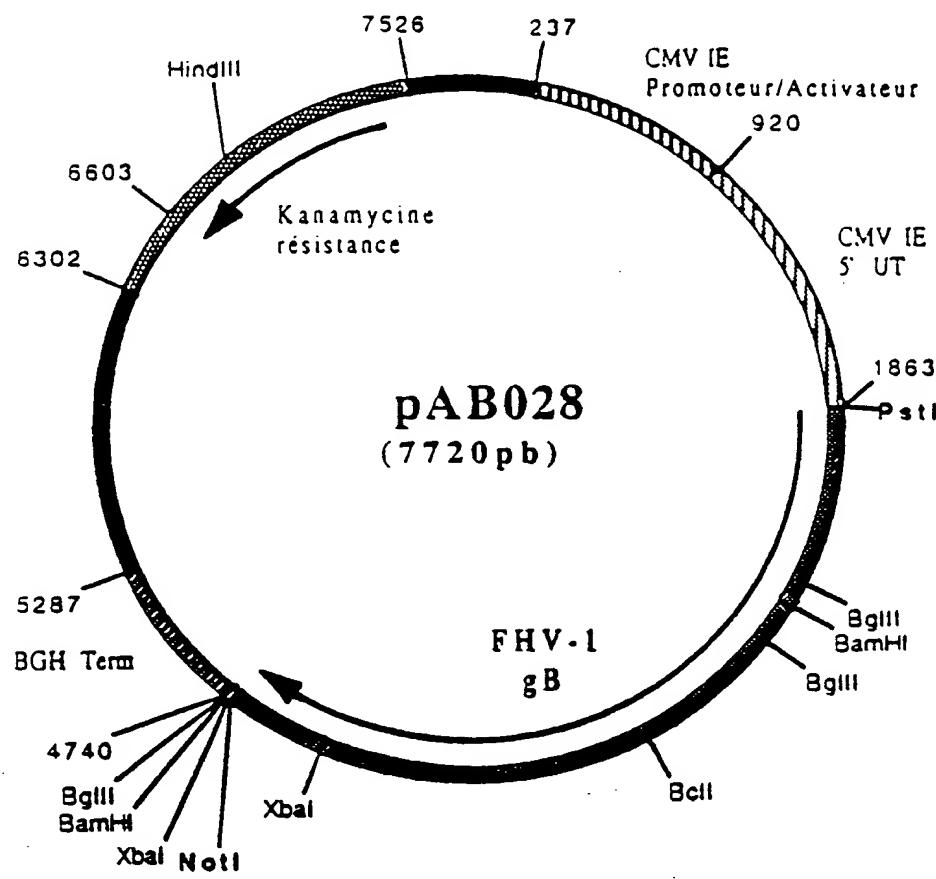


Figure N° 11

15/19

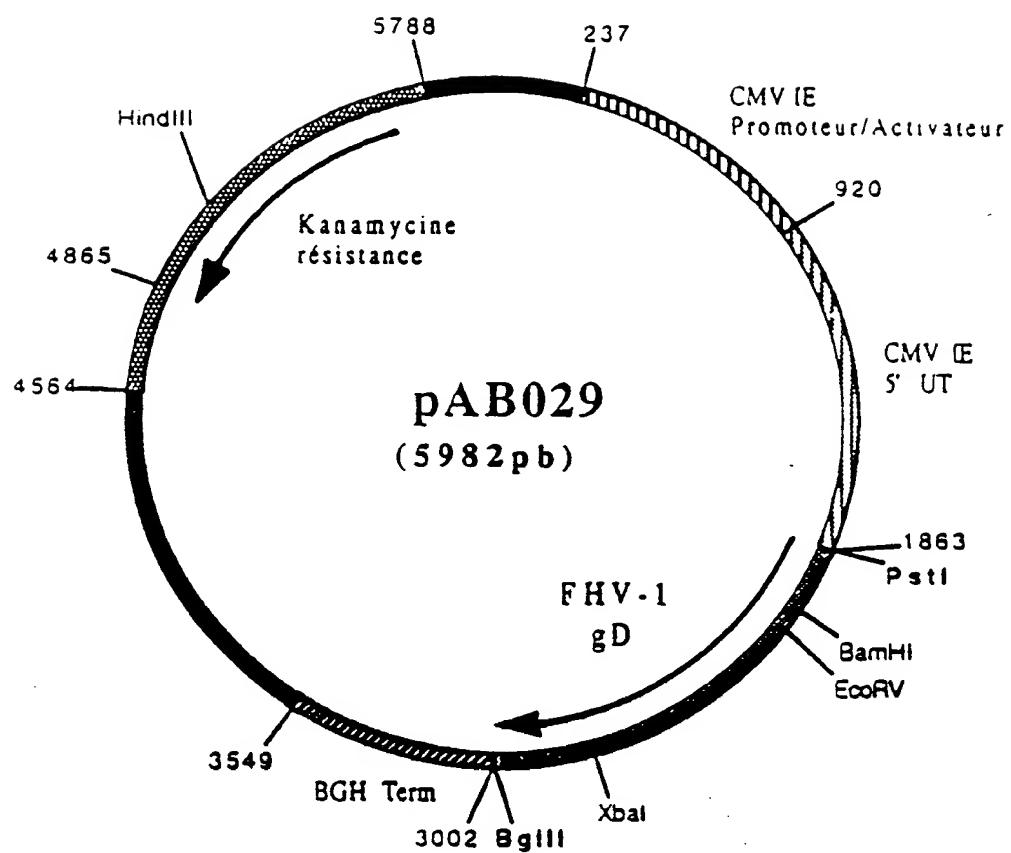


Figure N° 12

16/19

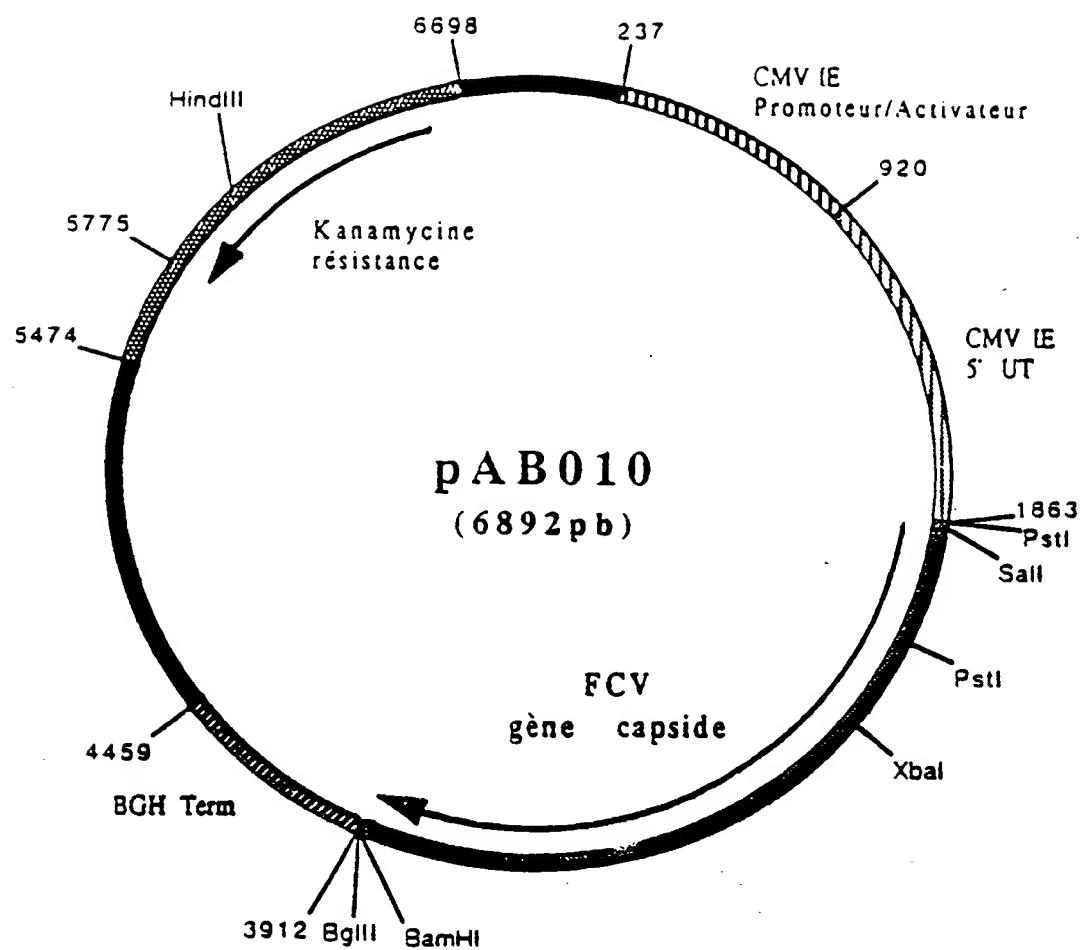


Figure N° 13

17/19

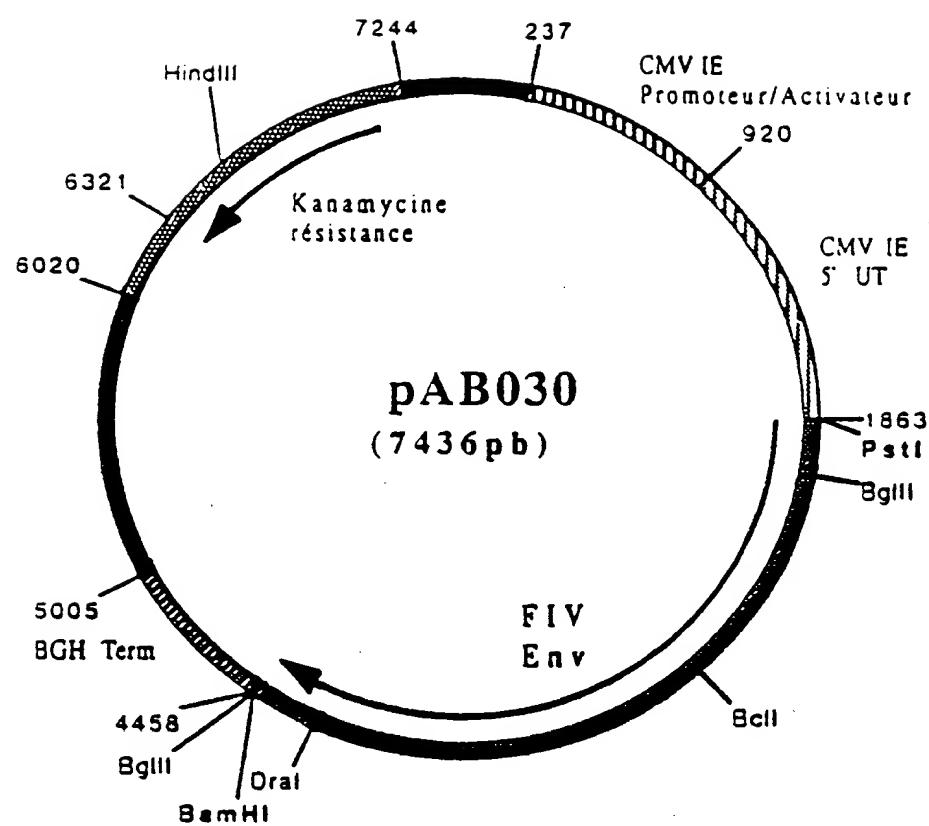


Figure N° 14

18/19

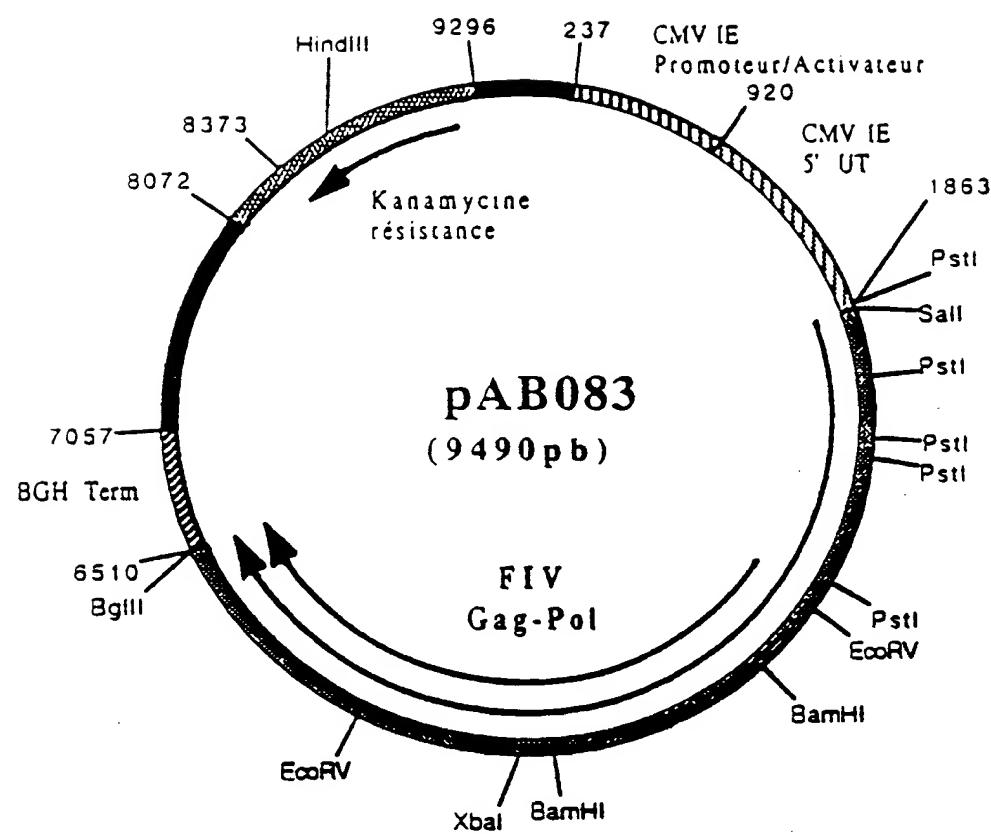


Figure N° 15

19/19

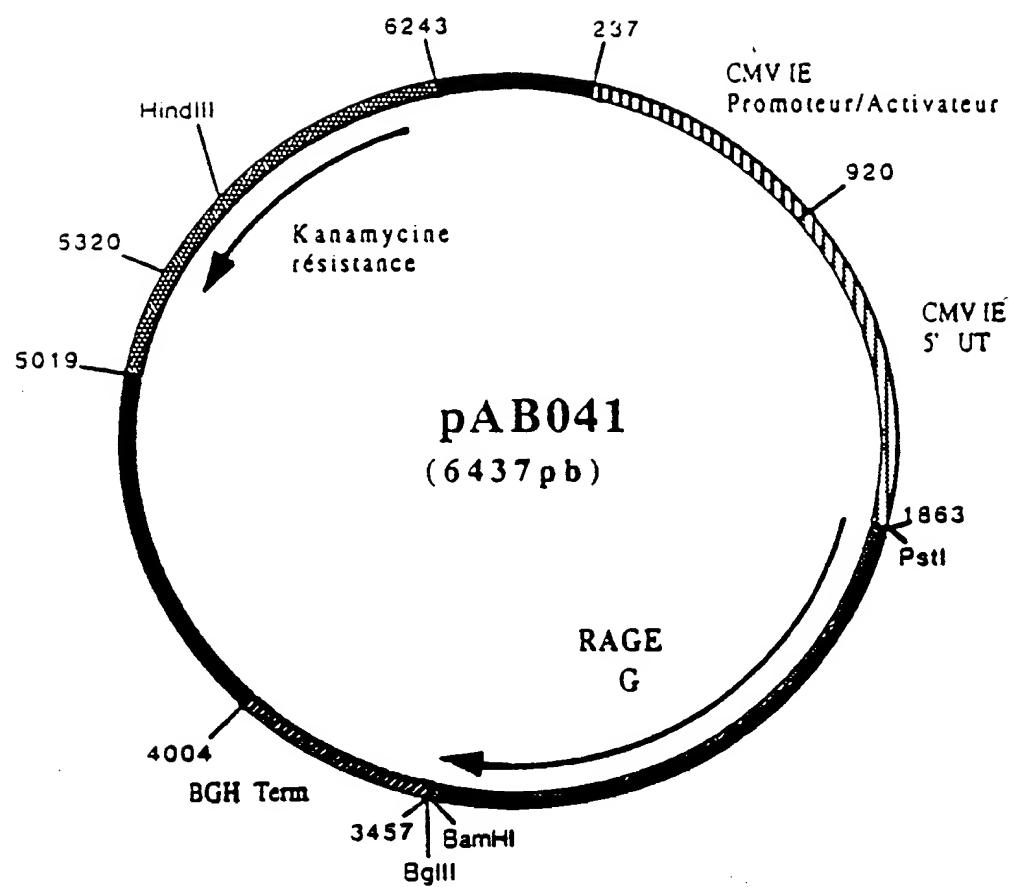


Figure N° 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/01315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C12N15/48	C12N15/35	C12N15/50	C12N15/38	C12N15/40
	C12N15/49	C12N15/47	A61K39/295		

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WARDLEY R C ET AL: "THE USE OF FELINE HERPESVIRUS AND BACULOVIRUS AS VACCINE VECTORS FOR THE GAG AND ENV GENES OF FELINE LEUKAEMIA VIRUS" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 73, no. PART 07, 1 July 1992, pages 1811-1818, XP000288657 * page 1811, abstract *	8
A	---	1-7, 9, 10
X	WO 96 06934 A (RHONE MERIEUX) 7 March 1996 cited in the application see claims 1,11	8
A	---	1-7, 9, 10
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

2 December 1997

09/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 97/01315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9606934 A	07-03-96	FR 2724385 A AU 3261295 A CA 2198743 A EP 0778894 A		15-03-96 22-03-96 07-03-96 18-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A JP 9508622 T US 5620896 A		03-08-95 06-11-96 02-09-97 15-04-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document de recherche internationale No
PCT/FR 97/01315

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N15/48	C12N15/35	C12N15/50	C12N15/38	C12N15/40
	C12N15/49	C12N15/47	A61K39/295		

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisée)

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WARDLEY R C ET AL: "THE USE OF FELINE HERPESVIRUS AND BACULOVIRUS AS VACCINE VECTORS FOR THE GAG AND ENV GENES OF FELINE LEUKAEMIA VIRUS" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 73, no. PART 07, 1 juillet 1992, pages 1811-1818, XP000288657 * page 1811, abrégé *	8
A	---	1-7, 9, 10
X	WO 96 06934 A (RHONE MERIEUX) 7 mars 1996 cité dans la demande voir revendications 1,11	8
A	---	1-7, 9, 10
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de dépôt d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
2 décembre 1997	09/12/1997
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 97/01315

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9606934 A	07-03-96	FR 2724385 A AU 3261295 A CA 2198743 A EP 0778894 A	15-03-96 22-03-96 07-03-96 18-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A JP 9508622 T US 5620896 A	03-08-95 06-11-96 02-09-97 15-04-97